Aus der Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

GERINNUNGSPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN NORMALEN UND LEUKÄMISCHEN LEUKOZYTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Norbert Heni
aus Ehingen

1980

Aus der Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

GERINNUNGSPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN NORMALEN UND LEUKÄMISCHEN LEUKOZYTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Norbert Heni
aus Ehingen

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. H. Heimann

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. E. Hiller
(Professor Dr. H. D. Waller)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1.	Ablauf der plasmatischen Gerinnung	1
1.2.	Einfluß von Leukozyten auf die Gerinnung	2
2.	Problemstellung	4
3.	Material und Methoden	
3.1.	Patientengut	5
3.2.	Leukozytenisolierung	6
3.3.	Gerinnungstests	8
3.3.1.	In den Gerinnungstests verwendete Materialien	8
3.3.2.	Celit - aktivierte Rekalzifizierungszeit	9
3.3.3.	Thrombelastographie nach Hartert	10
3.3.4.	Beeinflussung von Faktor VIII - bzw. IX - Mangelplasma durch Leukozyten	12
3.3.5	Prothrombinverbrauchstest	13
3.3.6	Zweistufentest nach Nemerson	15
4.	Ergebnisse	
4.1.	Celit - aktivierte Rekalzifizierungszeit	17
4.2.	Thrombelastographie	18
4.3.	Beeinflussung von Faktor VIII - bzw. IX - Mangelplasma durch Leukozyten	20
4.4.	Prothrombinverbrauchstest	22
4.5.	Zweistufentest nach Nemerson	25
5.	Diskussion	33
6.	Zusammenfassung	38
7.	Literaturverzeichnis	40

1. Einleitung

An der Blutstillung sind mehrere Mechanismen beteiligt. Nach der Verletzung eines Gefäßes kommt es als erstes zu einer Vasokonstriktion. Thrombozyten bilden an der verletzten Gefäßstelle ein lockeres Plättchenaggregat, das zur primären Blutstillung führt. Fibrin, das im Verlauf der plasmatischen Gerinnung gebildet wird, verfestigt den Plättchenthrombus.

1.1. Ablauf der plasmatischen Gerinnung

Der Blutgerinnungsprozeß kann als eine Serie von Proteinreaktionen aufgefaßt werden, in denen jeder Gerinnungsfaktor Substrat für die Aktion des vorangegangenen Reaktionsprozesses ist und gleichzeitig Enzym für die Umwandlung der nächsten Stufe wird (MacFarlane, 1964). Die Aktivierung des Gerinnungsablaufs kann über das endogene oder das exogene System erfolgen (Abbildung 1).

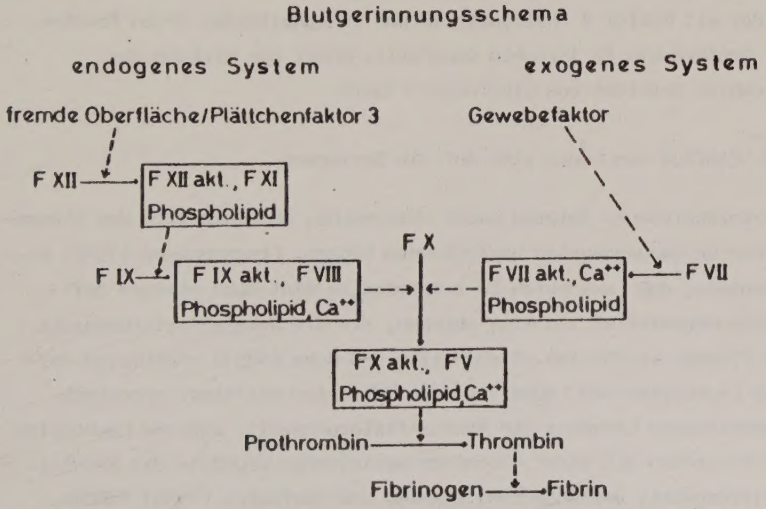

Abb. 1: Blutgerinnungsschema (modifiziert nach Rick, 1974)

Im endogenen System wird Faktor XII durch Kontakt mit unphysiologischen Flächen oder durch Plättchenfaktor 3 aus zerfallenen Thrombozyten in die aktive Form überführt. Aktiver Faktor XII, Faktor XI und ein Phospholipid aus Thrombozyten bilden einen enzymatisch wirksamen Komplex, der Faktor IX in die aktive Form umwandelt. Der aktive Faktor IX, Faktor VIII, Calciumionen und Phospolipide bilden den Faktor X - Aktivator des endogenen Systems.
Im exogenen System wird Faktor VII durch Gewebsthromboplastin aktiviert. Das Gewebsthromboplastin, das in allen Organen nachgewiesen wurde, ist ein Lipoprotein. Lunge, Gehirn und Plazenta sind besonders reich an Gewebsthromboplastin. Der aktive Faktor VII, Calciumionen und Phospholipide bilden den Faktor X - Aktivator des exogenen Systems. Nach anderer Auffassung (Nemerson, 1968; Prydz, 1969) bildet Faktor VII mit dem Gewebsthromboplastin einen Komplex, der zusammen mit Calciumionen und Phospholipiden Faktor X aktiviert.
Sowohl das exogene als auch das endogene Gerinnungssystem sind für einen normalen Gerinnungsablauf erforderlich.
Der durch das exogene oder endogene System aktivierte Faktor X bildet mit Faktor V, Calciumionen und Phospholipiden einen Komplex, der Prothrombin in Thrombin umwandelt. Unter der Wirkung des Thrombins entsteht aus Fibrinogen Fibrin.

1.2. Einfluß von Leukozyten auf die Gerinnung

Von verschiedenen Autoren wurde untersucht, ob Leukozyten das plasmatische Gerinnungssystem beeinflussen können. Lenggenhager (1949) beobachtete, daß Leukozyten im extravasalen Blut nach einiger Zeit "Gerinnungsstoffe" ins Blut abgeben, die die Rekalzifizierungszeit des Plasmas verkürzten. Nach Martin und Roka (1951) verkürzten normale Leukozyten und Leukozyten von Patienten mit einer chronisch lymphatischen Leukämie die Rekalzifizierungszeit, während Leukozyten von Patienten mit einer chronisch myeloischen Leukämie die Rekalzifizierungszeit verlängerten. Eiseman und Stefanini (1954) fanden, daß Leukozyten von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie, akuter myeloischer Leukämie und Monozytenleukämie den Prothrombinverbrauch im Serum erhöhten, während Leukozyten von Patienten mit

akuter lymphatischer und chronisch lymphatischer Leukämie den Prothrombinverbrauch nicht beeinflußten.

Rapaport und Hjort (1967) und Erdogan (1968) berichteten, daß Leukozyten eine dem Plättchenfaktor 3 ähnliche thromboplastische Aktivität besaßen.

Eine dem Gewebsthromboplastin ähnliche Aktivität von Leukozyten wurde von Rapaport und Hjort (1967), Niemetz (1972), Gralnick und Abrell (1973) und Saba et al. (1973) beschrieben. Dieser Befund wurde durch immunologische Kreuzreaktionen mit Extrakten von Promyelozyten und Hirnextrakten bestätigt (Gouault - Heilmann et al., 1975).

Neben einer gerinnungsfördernden Wirkung wurde auch eine gerinnungshemmende Wirkung von Leukozyten gefunden (Rapaport und Hjort, 1967; Saba et al., 1967; Lisiewicz, 1969; Lisiewicz et al., 1970).

2. Problemstellung

Im Verlauf von akuten, selten auch chronischen Leukämien kommt es sehr häufig zu Hämorrhagien. Die Blutungen lassen sich überwiegend durch die fast immer vorhandene Thrombozytopenie erklären.
Die generalisierte Blutungsneigung bei akuten Promyelozytenleukämien verbunden mit Hypofibrinogenämie, Faktor V - Mangel und Thrombozytopenie wurde durch eine Verbrauchskoagulopathie erklärt (Rosenthal, 1963; Didisheim et al., 1964; Straub et al., 1967; Gralnick et al., 1972 a).
Nach der Literatur zu urteilen, sind Verbrauchskoagulopathien bei chronischen Leukämien ungewöhnlich. Sowohl bei den chronisch myeloischen Leukämien (Seligman et al., 1975; German et al., 1976) als auch bei den chronisch lymphatischen Leukämien (Brown et al., 1962; Farkass, 1962) gibt es nur wenige Fallberichte über Verbrauchskoagulopathien.
Bei akuten myeloischen Leukämien scheinen Verbrauchskoagulopathien häufiger als allgemein angenommen vorzukommen (Lasch et al., 1971; Hey und Lasch, 1972; Gralnick et al., 1972 b).
In diesem Zusammenhang muß eine Beeinflussung des Gerinnungssystems durch Leukozyten diskutiert werden. So ist es vorstellbar, daß sowohl gerinnungsaktive wie auch gerinnungshemmende Substanzen aus den Leukozyten freigesetzt werden. Besonders nach Therapiebeginn kann es zum Untergang großer Zellmassen und damit zur Freisetzung gerinnungsaktiven Materials kommen.
In vitro Untersuchungen an isolierten Leukozyten sollten zur Klärung der Frage beitragen, ob dieselben die plasmatische Gerinnung im Sinne einer Aktivierung oder Hemmung beeinflussen können. Zu diesem Zweck wurden Leukozyten von Normalpersonen, von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie, chronisch lymphatischer Leukämie und akuter Leukämie isoliert und verschiedenen Gerinnungssystemen zugesetzt.

3. Material und Methoden

3.1. Patientengut

Die Leukozyten wurden aus Blut von Patienten der medizinischen Universitätsklinik Tübingen gewonnen. Die Patienten wurden in vier Gruppen aufgeteilt:

1. Nicht hämatologisch erkrankte Patienten, d.h. Patienten mit normalen Leukozyten (NL). Um eine ausreichende Leukozytenzahl für die Gerinnungsuntersuchungen zu erhalten, wurde überwiegend Blut von Patienten mit einer Leukozytose verwendet. Die Differentialbluthilder ergaben daher einen relativ hohen Anteil an Granulozyten.
2. Patienten mit einer chronisch myeloischen Leukämie (CML)
3. Patienten mit einer chronisch lymphatischen Leukämie (CLL)
4. Patienten mit einer akuten Leukämie (AL)

Die Blutbilder ergaben folgende Leukozytenverteilung:

NL: Granulozyten MW = 84,3 %, davon 1,6 % Jugendliche und 9,7 % Stabkernige
Lymphozyten MW = 11,8 %
Monozyten MW = 3,9 %

CML: granulozytäre Zellen MW = 90,7 %, davon 3,3 % Blasten, 1,7 % Promyelozyten, 5,9 % Myelozyten, 7,4 % Jugendliche und 10,3 % Stabkernige
Lymphozyten MW = 5,8 %
Monozyten MW = 3,5 %

CLL: Lymphoblasten und Lymphozyten MW = 96,1 %
Granulozyten MW = 3,6 %
Monozyten MW = 0,3 %

AL: Blasten MW = 87,1 %
Granulozyten MW = 6,5 %
Lymphozyten MW = 5,0 %
Monozyten MW = 1,4 %

Leukozyten von 11 Normalpersonen, 12 Patienten mit CML, 11 Patienten mit CLL und 10 Patienten mit AL wurden isoliert.
Die 10 akuten Leukämien ließen sich klinisch und zytochemisch in akute myeloische Leukämie (4), akute myelomonozytäre Leukämie (2), Blastenschub einer CML (1), akute undifferenzierte Leukämie (2) und immunoblastisches Sarkom mit leukämischer Verlaufsform (1) aufteilen.

3.2. Leukozytenisolierung

Materialien und Reagenzien zur Leukozytenanreicherung:

1. Zur Blutentnahme:
   Natrium - Citrat, 3,8 % nach Westergren

2. Zur Leukozytenanreicherung:
   a) Aqua dest., Ampuwa (Fresenius, Bad Homburg)
   b) Ronpacon^R- Dextran - Lösung
      Ronpacon^R "Cilag" 75 % (Cilag Chemie, Alsbach)
      Dextran 500 "Pharmacia" (Fine Uppsala, Schweden)
      Herstellung der Lösung:
      I) Eine Ampulle Ronpacon^R (20 ml 75 %) wurde mit Ampuwa auf 45,7 ml,d.h. folgende Werte verdünnt: 32,8 %, Dichte 1,200 $\pm$ 0,001 g/ml, pH = 7,3 $\pm$ 0,3
      II) 4,02 g Dextran 500 wurden in 67 ml Ampuwa aufgelöst. Es ergab sich eine 6 % Lösung.
      III) Die 67 ml 6 % Dextranlösung wurde mit 33 ml 32,8 % Ronpacon^R- Lösung vermischt. Es ergaben sich 100 ml Sedimentierflüssigkeit. Die Dichte betrug nun 1,07 - 1,08 g/ml.
      Die Ronpacon^R- Dextran - Lösung wurde bei 4^0 C aufbewahrt.
   c) 0,9 % Natriumchloridlösung (Fresenius, Bad Homburg)
   d) 3,6 % Natriumchloridlösung
   e) Borat - Borsäurepuffer, pH = 7,7
      Herstellung der Lösung:
      I) 19,1 g Na - Tetraborat ($Na_2B_4O_7$ x 10 H_2O) wurden in 1 l aqua dest. gelöst. Die Lösung war 0,05 molar.
      II) 12,4 g Borsäure (H_3BO_4) wurden in 1 l aqua dest. gelöst.

Die Borsäurelösung war 0,2 molar.
Man mischte 15 ml Tetraboratlösung mit 85 ml Borsäurelösung und gab 260 mg Natriumchlorid pro 100 ml zu. Die Lösung wurde dann mit der Na - Tetraboratlösung auf einen pH = 7,7 eingestellt.

Prinzip und Methode der Leukozytenisolierung:

Die Methode wurde von Bøyum (1964, 1968) übernommen.
Zur Leukozytenisolierung aus Blut wird Ronpacon^{R}- Dextran - Lösung verwendet. Ronpacon^{R}- Dextran - Lösung wird vorsichtig mit Zitratblut überschichtet. Das hochpolymere Dextran aggregiert an der Grenzschicht die Erythrozyten, die dann sedimentieren. Die Leukozyten werden aus dem Überstand isoliert (Abbildung 2).

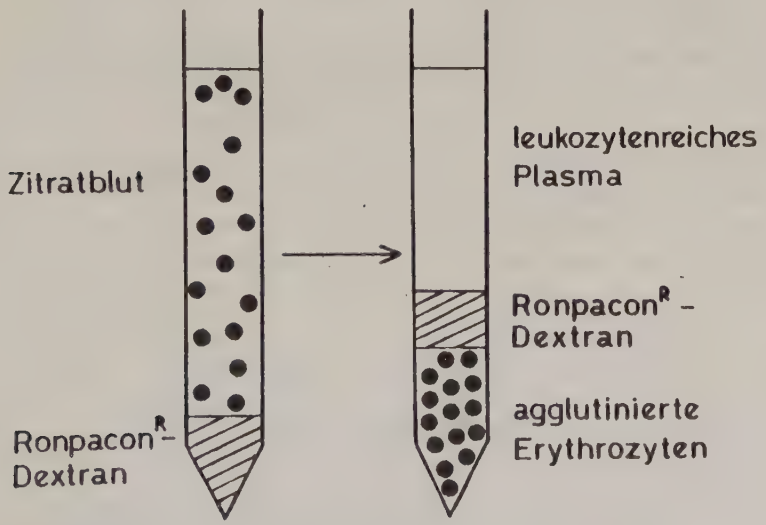

Abb. 2: Prinzip der Isolierung von Leukozyten aus Zitratblut

Ausführung:
Von einem Patienten wurden immer 20 ml Zitratblut (1 Teil 3,8 % Na - Zitrat, 9 Teile Blut) abgenommen, um eine genügende Menge Leukozyten zu erhalten.

3 bis 4 ml Ronpacon^{R}- Dextran - Lösung wurden in ein Kunststoffröhrchen gegeben. Die Lösung wurde vorsichtig mit etwa 10 ml Zitratblut überschichtet. Man ließ die Röhrchen bei Raumtemperatur ca. 60 min stehen, bis die Erythrozyten sedimentiert waren. Der leukozytenreiche Überstand wurde abpipettiert und 5 min lang bei 50 - 60 g zentrifugiert. Der jetzt entstandene Überstand wurde verworfen.
Das gewonnene Sediment, in dem Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten enthalten waren, wurde mit 1 ml 0,9 % NaCl suspendiert. Die noch vorhandenen Erythrozyten wurden durch "hypotone Hämolyse" entfernt. Man gab zu der Zellsuspension 3 ml aqua dest. und ließ dieses 30 sec lang einwirken. Unmittelbar danach gab man 1 ml 3,6 % NaCl hinzu, um die Suspension wieder isoton zu machen. Es wurde wieder 5 min bei 50 - 60 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.
Das Sediment wurde insgesamt 4 x mit Boratpuffer gewaschen, um die noch vorhandenen Thrombozyten zu entfernen. Das gewaschene Sediment wurde nun in 0,5 - 1,0 ml Boratpuffer suspendiert. Die Leukozyten wurden gezählt und auf eine Konzentration von 20.000 Leukozyten/mm^3 eingestellt. Bei hoher Zellzahl wurden zusätzlich Aliquots von 100.000 Leukozyten/mm^3 hergestellt. Die Leukozyten wurden bei einer Temperatur von minus 28^{0}C eingefroren.

3.3. Gerinnungstests

3.3.1. In den Gerinnungstests vewendete Materialien

Leukozyten:
Vor Versuchsbeginn wurden die Leukozyten 15 sec bei 40 Watt mit Ultraschall (Ultraschallgerät Sonifier B - 12, Branson Sonic Power Comp. Danbury, Connec.) behandelt, um eine gleichmäßige Suspension zu erhalten. Die Zerstörung durch Ultraschall oder durch Einfrieren - Auftauen ergaben nach Gralnick und Abrell (1973) ähnliche Untersuchungsergebnisse in den Gerinnungstests.

Normalplasma:

Das Normalplasma wurde jeweils von einer identischen Kontrollperson (N.H.) gewonnen. 9 Teile Venenblut wurden mit 1 Teil 3,8 % Natriumzitratlösung nach Westergren vermischt und dann bei 800 g 10 min lang zentrifugiert.

Pufferkontrolle:

Es wurde Boratpuffer verwendet. Die Herstellung ist im Abschnitt "Isolierung von Leukozyten" beschrieben.

3.3.2. Celit - aktivierte Rekalzifizierungszeit

Prinzip:

Die Rekalzifizierungszeit ist ein Globaltest für das endogene System der Blutgerinnung. Durch Zusatz von Celit (Celit Puder, Roth, Karlsruhe) wird das Testsystem maximal aktiviert und die Reproduzierbarkeit besser (Voss, 1964).

Ausführung (Abbildung 3):

Rekalzifizierungszeit

In Glasröhrchen geben

9 mg Celit
0,1 ml Leukozytenlysat bzw. Puffer
0,1 ml Normalplasma

während 2 min Inkubation bei 37° C schütteln, dann

0,1 ml 0,025 m $CaCl_2$ zugeben

Zeit stoppen, sobald Gerinnsel auftritt.

Abb. 3: Bestimmung der Rekalzifizierungszeit

In ein Glasröhrchen wurden 9 mg Celit, 0,1 ml Leukozytenlysat bzw. Boratpuffer und 0,1 ml thrombozytenarmes Normalplasma gegeben. Das Glasröhrchen wurde 2 min bei 37°C in einem Rüttler geschüttelt. Dann wurde 0,1 ml 0,025 m Calciumchloridlösung (vorinkubiert bei 37°C) zugegeben, gleichzeitig die Stoppuhr gedrückt. Das Gläschen blieb noch 20 sec im Wasserbad stehen. Danach wurde es herausgenommen, um den Gerinnungsablauf zu beurteilen. Die Zeit bis zum Auftreten des ersten Fibrinfadens wurde gestoppt. Leukozytenlysate mit einer Anzahl von 20.000, 5.000 und 1.000 Leukozyten/mm^3 wurden verwendet. Leukozyten von 11 Normalpersonen, 12 Patienten mit CML, 11 Patienten mit CLL und 10 Patienten mit AL wurden untersucht. Es wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.3.3. Thrombelastographie nach Hartert (1971)

Prinzip:
Das Thrombelastogramm (TEG) wird mit dem Thrombelastographen (Fa. Hellige, Freiburg) geschrieben. Die Abbildung 4 zeigt schematisch einen Thrombelastographen.
Nativblut wird in den freien Raum zwischen Küvette und Stempel gefüllt und mit einer Schicht Paraffinöl gegen Austrocknung geschützt. Solange das Blut in der Küvette ungeronnen ist, bewegt sich der Stempel nicht. Auf dem Phototpapier erscheint eine gerade Linie. Sobald sich zwischen der Küvettenwand und dem Stempel Fibrinfäden ausbilden, wird die periodische Bewegung der Küvette auf den Stempel und daher auch über den Spiegel auf das Photopapier weitergeleitet. Die Amplitude erreicht bei vollständiger Gerinnung ein Maximum.
3 Parameter, r - Zeit, k - Zeit und maximale Amplitude (m_a) lassen sich aus dem Thrombelastogramm bestimmen.

r - Zeit:
Der Abstand vom Beginn der Aufzeichnung bis zu dem Punkt, an dem die Amplitude 1 mm erreicht hat, wird als r - Zeit (Reaktionszeit) bezeichnet und entspricht der Gerinnungszeit.

k - Zeit:

Die Zeit vom Ende der r - Zeit bis zu dem Punkt, an dem die Amplitude 20 mm erreicht hat, heißt k - Zeit oder Thrombusbildungszeit (Gerinnselbildungszeit). Die k - Zeit ist ein Maß für die Geschwindigkeit, mit der ein Gerinnsel einer bestimmten Festigkeit gebildet wird.

Maximale Amplitude (m_a):

Da die Gerinnung fortschreitet und das Gerinnsel eine maximale Festigkeit erreicht, erreicht die Amplitude ein Maximum. Die m_a wird in mm gemessen.

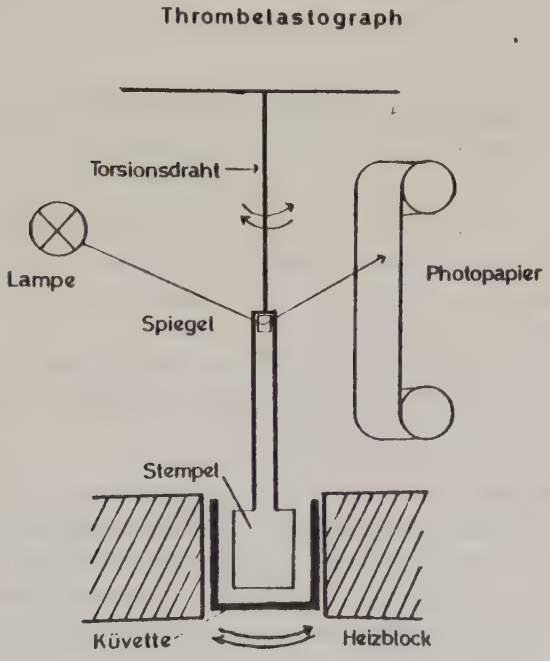

Abb. 4: Schema eines Thrombelastographen

Ausführung:
0,05 ml Leukozytenlysat bzw. Boratpuffer wurden in eine Küvette pipettiert. 0,3 ml eigenes venöses Vollblut wurde möglichst rasch mit dem Leukozytenlysat bzw. Boratpuffer vermischt. Die Küvette wurde sofort in den Thrombelastographen gesetzt und das Blut mit Paraffinöl überschichtet.
Leukozyten von 10 Normalpersonen, 11 Patienten mit CML, 11 Patienten mit CLL und 10 Patienten mit AL wurden in einer Konzentration von 20.000 und 5.000/mm^3 verwendet.

3.3.4. Beeinflussung von Faktor VIII - bzw. IX - Mangelplasma durch Leukozyten

Prinzip:
Die Faktor VIII - bzw. Faktor IX - Bestimmung basiert auf der Partiellen - Thromboplastinzeit. Die Aktivierung des Gerinnungsablaufs erfolgt durch Cephaloplastin (akt. Cephaloplastin, nicht gepuffert, Merz und Dade, München). Cephaloplastin enthält ein Phospholipid, das einen Plättchenfaktor 3 - Ersatz darstellt. Wird anstatt eines Normalplasmas ein Faktor VIII - bzw. Faktor IX - Mangelplasma (Merz und Dade, München) verwendet, so wird die Gerinnungszeit stark verlängert.
Im Rahmen unserer Untersuchung sollte geprüft werden, inwieweit Leukozyten die verlängerte Gerinnungszeit von Faktor VIII - bzw. Faktor IX - Mangelplasma beeinflussen.

Ausführung (Abbildung 5):
In ein Jenaer Glasröhrchen wurden 0,1 ml Leukozytenlysat mit einer Konzentration von 20.000 Leukozyten/mm^3 bzw. Boratpuffer als Kontrolle, 0,1 ml Faktor VIII - bzw. Faktor IX - Mangelplasma und 0,1 ml Cephaloplastin pipettiert. Nach 2 - minütiger Inkubation bei 37°C gab man 0,1 ml 0,025 m $CaCl_2$ zu. Sobald ein Gerinnsel auftrat, wurde die Zeit gestoppt. Leukozyten von 10 Normalpersonen, 12 Patienten mit CML, 11 Patienten mit CLL und 10 Patienten mit AL wurden dem Testsystem zugesetzt. Es wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt.

FAKTOR VIII und IX

In Glasröhrchen pipettieren

0,1 ml Leukozytenlysat bzw. Puffer

0,1 ml Mangelplasma

0,1 ml Cephaloplastin

2 min bei 37°C inkubieren, dann

0,1 ml 0,025 m $CaCl_2$ zugeben

und gleichzeitig Stoppuhr starten, bei Gerinnselbildung Zeit stoppen.

Abb. 5: Testsystem, um den Einfluß von Leukozyten auf F. VIII - bzw. F. IX Mangelplasma zu bestimmen

3.3.5. Prothrombinverbrauchstest

Prinzip:
Man läßt Normalblut gerinnen und bestimmt im Serum die Aktivität des verbliebenen Prothrombins. Die Prothrombinaktivität wird mit Hilfe eines modifizierten Quicktests gemessen (Bowie et al., 1971). Im Serum fehlen Faktor V und Fibrinogen, die deshalb in Form von adsorbiertem prothrombinfreiem Kaninchenplasma (Merz und Dade, München) zugegeben werden müssen. Zur Aktivierung des exogenen Systems wird Thromboplastin (Behringwerke, Marburg) verwendet. Je kürzer die Serumprothrombinzeit ist, desto mehr restliches Prothrombin ist im Serum vorhanden.

Ausführung (Abbildung 6):

Um den Einfluß der Leukozyten auf den Prothrombinverbrauch zu bestimmen, wurden 0,2 ml Leukozytenlysat in einer Konzentration von 20.000/mm^3 mit 2 ml Normalvollblut gut vermischt. Im Kontrollansatz wurden 0,2 ml Boratpuffer verwendet. Die Röhrchen wurden 1 Stunde lang bei 37°C im Wasserbad bis zur vollständigen Gerinnung inkubiert. Das aufgetretene Gerinnsel wurde von der Röhrchenwand mit einem Holzstäbchen entfernt.

Die Röhrchen wurden dann 2 min lang bei 300 g (2.000 U/min) zentrifugiert, ins Wasserbad zurückgestellt, und nach 5 min wurde der Prothrombingehalt im Serum bestimmt. Hierzu wurden 0,1 ml adsorbiertes Kaninchenplasma und 0,2 ml auf 37°C vorgewärmtes Calciumthromboplastin in ein Röhrchen einpipettiert und nach 60 sec 0,1 ml des Serums zugegeben. Die Gerinnungszeit wurde im Koagulometer (nach Schnitger und Gross, Amelung, Brake) gemessen.

Prothrombinverbrauchstest

In Teströhrchen geben

0,2 ml Leukozytenlysat bzw. Puffer

2,0 ml Normal-Vollblut

1 Std. bei 37°C inkubieren, dann Gerinnsel ablösen, 2 min bei 2.000 U/min zentrifugieren, 5 min Inkubation bei 37°C

In Teströhrchen geben

0,1 ml adsorbiertes Kaninchenplasma

0,2 ml Ca-Thromboplastin

nach 60 sec Inkubation

0,1 ml des oben gewonnenen Serums

zugeben, Gerinnungszeit im Koagulometer bestimmen.

Leukozyten von 10 Normalpersonen, 12 Patienten mit CML, 11 Patienten mit CLL und 10 Patienten mit AL wurden untersucht. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Abb. 6: Prothrombinverbrauchstest

3.3.6. Zweistufentest nach Nemerson

Prinzip:

Mit dem Zweistufentest nach Nemerson (1966, 1968) kann die Gewebsthromboplastinaktivität von Leukozyten bestimmt werden. Im exogenen System der Blutgerinnung verbindet sich Gewebsthromboplastin mit Faktor VII zu einem Komplex, der dann unter Mitwirkung von Phospholipiden und Calcium Faktor X aktiviert. Gerinnungshemmende Stoffe, die möglicherweise in Leukozyten vorhanden sind, beeinflussen den Test im allgemeinen nicht.

In der ersten Stufe des Tests erfolgt die Aktivierung des Faktors X. Die Reaktion wird durch Natriumzitrat gestoppt. In der zweiten Stufe wird der aktivierte Faktor X zu einer Lösung aus Normalplasma und Phospholipiden (Inosithin) gegeben. Nach Zugabe von Calciumchlorid läuft der Gerinnungsvorgang zu Ende ab.

Die Gerinnungszeit ist eine Funktion der Gewebsthromboplastinaktivität. Auf doppellogarithmischem Papier aufgetragen, ergibt sich eine Gerade.

Zum Zweistufentest benötigte Reagenzien:

1. Faktor VII/X - Konzentrat wurd im Gerinnungslabor der Medizinischen Klinik Tübingen aus gealtertem Bankblut nach der Methode von Nemerson (1966, 1968) angereichert und in Aliquots von 1 ml bei minus 65^{0}C eingefroren.
2. 0,025 m Calciumchlorid, Behringwerke, Marburg
3. 0,015 m Natriumzitratlösung (441 mg/100 ml)
4. Zitratplasma einer Kontrollperson
5. 0,5 % Inosithinlösung, Associated Concentrates, Woodside N.Y.,USA

Ausführung (Abbildung 7):

Alle Reagenzien wurden auf 37^{0}C vorgewärmt. Der Test wurde bei 37^{0}C durchgeführt.

Das erste Stufengemisch von 0,1 ml Zellysat und 0,1 ml Faktor VII/X - Konzentrat wurde 5 min lang inkubiert. 0,05 ml 0,025 m $CaCl_2$ wurde hinzugefügt. Nach 1 min wurde die Reaktion gestoppt, indem man 0,1 ml der Inkubationslösung zu 0,4 ml 0,015 m Natriumzitrat hinzugab.

Das zweite Stufengemisch bestand aus 0,1 ml der obigen Lösung, 0,1 ml Normalplasma und 0,1 ml Inosithinlösung. Nach 15 sec Inkubation wurde 0,1 ml 0,025 m $CaCl_2$ zugegeben und die Gerinnungszeit im Koagulometer bestimmt.

Es wurden Leukozytenlysate im einer Konzentration von 20.000, 5.000 und 1.000 Leukozyten/mm^3 verwendet. In einigen Fällen wurden auch Leukozyten in einer Konzentration von 100.000 und 50.000/mm^3 untersucht. Bei 7 Normalpersonen, 6 Patienten mit CML, 7 Patienten mit CLL und 6 Patienten mit AL wurde die Gewebsthromboplastinaktivität bestimmt. Es wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt.

Zweistufentest nach Nemerson

1. Stufe

0,1 ml Faktor VII/X Konzentrat
0,1 ml Leukozytenlysat bzw. Puffer
5 min Inkubation bei 37°C, dann

0,05 ml 0,025 m $CaCl_2$ zugeben
1 min Inkubation bei 37°C

0,1 ml der obigen Inkubationslösung zu
0,4 ml 0,015 m Natriumzitratlösung geben

2. Stufe

0,1 ml Normalplasma
0,1 ml Inosithinlösung
0,1 ml der oben erhaltenen Lösung
15 sec Inkubation bei 37°C

0,1 ml 0,025 m $CaCl_2$ zugeben
Gerinnungszeit im Koagulometer bestimmen

Abb. 7: Zweistufentest nach Nemerson

4. Ergebnisse

4.1. Celit - aktivierte Rekalzifizierungszeit

Die Zugabe von Lysaten normaler und leukämischer Leukozyten zum Testansatz der aktivierten Rekalzifizierungszeit führte zu keiner Gerinnungszeitverkürzung, sondern zu einer Gerinnungszeitverlängerung bei Vergleich mit der jeweiligen Kontrolluntersuchung (Tab. 1). Wie die Abbildung 8 zeigt, unterscheiden sich normale und leukämische Leukozyten nicht wesentlich in der Beeinflussung der Gerinnungszeiten. Mit höherer Leukozytenkonzentration wurde die Gerinnungszeit länger.
Der globale Gerinnungstest, der das gesamte endogene System erfaßt, ist wahrscheinlich zu unspezifisch, um mögliche Unterschiede zwischen den normalen und leukämischen Zellen aufzuzeigen.

Leukozyten/mm^3	NL(n=11)		CML(n=12)		CLL(n=11)		AL(n=10)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
20.000	62,3	4,1	61,6	7,2	61,7	5,3	59,1	9,8
5.000	59,5	5,0	53,3	5,4	59,8	3,5	52,5	5,0
1.000	56,5	4,7	50,8	6,5	57,0	5,9	52,0	6,5
Kontrolle	55,8	5,8	47,8	9,1	56,6	6,7	50,4	7,7

Tab. 1: Beeinflussung der Rekalzifizierungszeit durch normale und leukämische Leukozyten (sec)

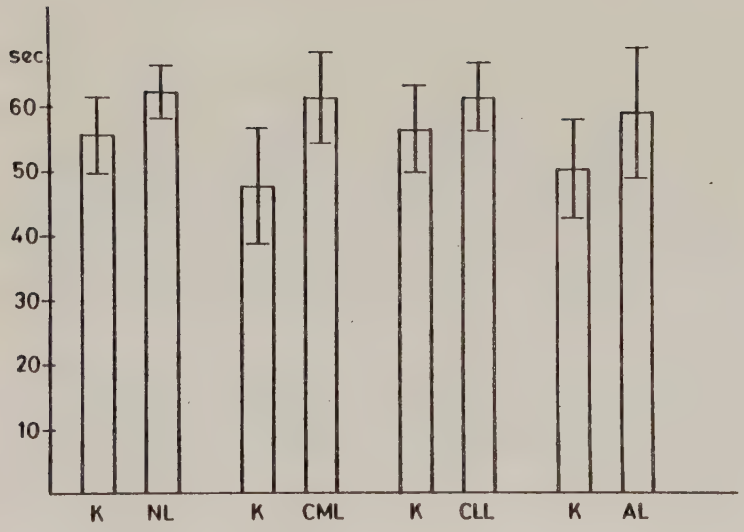

Abb. 8: Beeinflussung der Rekalzifizierungszeit durch Leukozyten (K = Boratpufferkontrolle, Leukozyten in einer Konzentration von 20.000/mm^3)

4.2. Thrombelastographie

Leukozytenlysate in einer Konzentration von 20.000 und 5.000 Leukozyten/mm^3 wurden Nativblut zugesetzt, und der Gerinnungsvorgang wurde im Thrombelastographen verfolgt. Als Kontrolle diente Boratpuffer.

Das Thrombelastogramm in Abbildung 9 wurde als repräsentatives Beispiel für den Einfluß normaler Leukozyten auf das Thrombelastogramm ausgewählt.

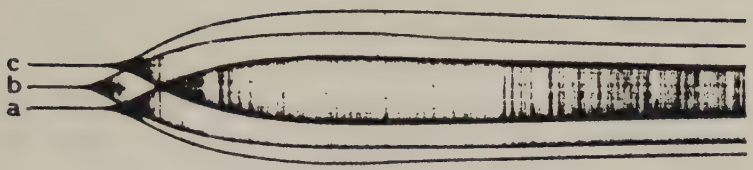

Abb. 9: Einfluß normaler Leukozyten auf das Thrombelastogramm
a) 20.000 Leukozyten/mm^3 b) 5.000 Leukozyten/mm^3
c) Boratpufferkontrolle

Man erkennt aus Tabelle 2, daß die Zugabe von Leukozyten zu Nativblut im Vergleich zum Kontrollansatz zu einer Verkürzung der r - Zeiten führte. Die Verkürzung der r - Zeiten war bei Verwendung von Leukozyten mit einer Konzentration von 5.000/mm^3 ausgeprägter als bei Verwendung von 20.000 Leukozyten/mm^3.
Zwischen normalen Leukozyten und Leukozyten akuter und chronischer Leukämien ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, führten Leukozytenlysate von normalen und leukämischen Leukozyten zu keiner Beeinflussung der k - Zeit.

Auch die maximale Amplitude (m_a) wurde nach Zugabe von Leukozytenlysaten nicht beeinflußt (Tabelle 4).

Die Gerinnselbildungszeit (k) und die Gerinnselfestigkeit wurden also durch Leukozyten bei Konzentrationen von 20.000 und 5.000 Leukozyten/mm^3 nicht beeinflußt.

Leukozyten/mm^3	NL (n=10)		CML (n=11)		CLL (n=11)		AL (n=10)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
20.000	10,1	1,6	11,5	4,3	9,7	1,9	9,6	3,6
5.000	8,6	1,1	10,2	3,7	8,7	2,1	8,1	2,4
Kontrolle	11,4	1,3	13,0	4,3	11,4	2,7	9,8	2,3

Tab. 2: Beeinflussung der r - Zeit durch Leukozyten (min)

Leukozyten/mm³	NL (n=10)		CML (n=11)		CLL (n=11)		AL(n=10)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
20.000	11,6	2,1	12,0	2,7	9,9	2,7	10,4	2,2
5.000	10,9	1,2	12,2	4,0	11,1	2,5	10,5	2,5
Kontrolle	11,6	1,9	12,5	3,1	11,1	1,2	9,7	2,2

Tab. 3: Beeinflussung der k - Zeit durch Leukozyten (min)

Leukozyten/mm³	NL (n=10)		CML (n=11)		CLL (n=11)		AL (n=10)	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
20.000	35,0	4,3	34,7	2,1	33,9	3,2	34,7	2,2
5.000	35,7	4,2	35,5	5,2	34,6	2,5	35,8	2,7
Kontrolle	35,3	4,6	33,9	1,7	34,3	1,3	35,0	1,9

Tab. 4: Beeinflussung der maximalen Amplitude durch Leukozyten (mm)

4.3. Beeinflussung von Faktor VIII - bzw. Faktor IX - Mangelplasma durch Leukozyten

Aus Tabelle 5 ist ersichtlich, daß Leukozyten die Gerinnungszeiten von Faktor VIII - und Faktor IX - Mangelplasma in gleicher Weise beeinflußten, d.h. Leukozyten führten im Vergleich zur Pufferkontrolle zu längeren Gerinnungszeiten.

	F. VIII - Mangelplasma		F. IX - Mangelplasma	
	$\bar{x}$(sec)	s(sec)	$\bar{x}$(sec)	s(sec)
NL (n=10)	141,0	10,2	185,6	26,4
CML (n=12)	152,0	25,5	183,5	30,5
CLL (n=11)	193,0	23,4	211,4	48,0
AL (n= 9)	192,2	27,4	211,3	61,2
Kontrolle	135,6	13,2	144,7	18,6

Tab.5: Einfluß von Leukozyten auf Faktor VIII - und IX - Mangelplasma

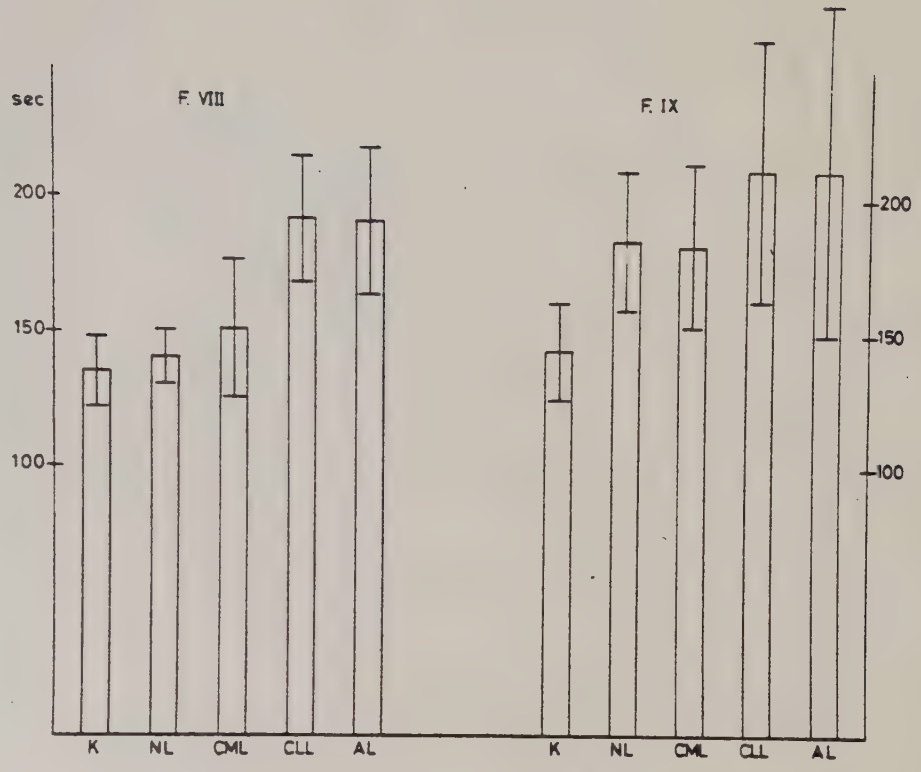

Abb. 10: Einfluß von Leukozyten (20.000/mm^3) auf Faktor VIII - und IX - Mangelplasma, K = Boratpufferkontrolle

Die Gerinnungszeiten von Faktor VIII - bzw. Faktor IX - Mangelplasma wurden durch normale Leukozyten und Leukozyten von CML - Patienten in ähnlicher Weise beeinflußt, indem sie die Gerinnungszeit um 5 - 15 sec bei Faktor VIII - Mangelplasma und um ca. 40 sec bei Faktor IX - Mangelplasma im Vergleich zum Kontrollansatz verlängerten (Abbildung 10). Leukozyten von Patienten mit AL und CLL verlängerten die Gerinnungszeit stärker (ca. 60 sec).
Die Leukozyten des Patienten H.H. mit einer akuten Leukämie wiesen eine Besonderheit auf. Gab man diese Leukozyten zu Faktor VIII - bzw. Faktor IX - Mangelplasma, so trat keine Gerinnung ein. Nach 360 sec wurde der Test abgebrochen. Dieses Ergebnis konnte für die Berechnung des Mittelwertes nicht verwendet werden. In diesem Fall muß man annehmen, daß die gerinnungshemmende Wirkung überwog, und es deshalb nicht zu einer Gerinnung kam.

4.4. Prothrombinverbrauchstest

Es wurde die Änderung des Prothrombinverbrauchs bei Zugabe von normalen und leukämischen Leukozyten zu Nativblut untersucht. Als Kontrolle diente Boratpuffer. Die Einzelergebnisse sind in Tabelle 6, die Mittelwerte und Standardabweichungen in Tabelle 7 aufgeführt.
Der Meßwert des Patienten H.G. mit einer CML wurde als "Ausreißer" gewertet und in der Berechnung nicht berücksichtigt.

Wie aus Abbildung 11 hervorgeht, verringerten die normalen und leukämischen Zellen bei Zugabe zu Nativblut den Prothrombinverbrauch. Die Leukozyten von Normalpersonen und von Patienten mit CML entfalteten eine stärkere gerinnungshemmende Wirkung als die Leukozyten von Patienten mit AL. Die Leukozyten von Patienten mit CLL beeinflußten den Prothrombinverbrauch am geringsten.

	NL	K		CML	K
	sec	sec		sec	sec
A.R.	12,1	20,0	H.A.	14,5	24,3
L.H.	13,3	20,0	H.G.	16,0	26,9
L.B.	12,5	20,0	H.T.	11,5	20,5
A.B.	15,3	25,5	O.H.	14,3	28,5
J.M.	14,8	25,5	E.G.	25,8	28,5
U.K.	14,3	25,5	A.L.	14,0	23,2
A.D.	15,3	23,2	F.H.	14,0	23,2
A.S.	16,4	23,2	E.F.	13,9	23,2
E.Z.	16,0	23,2	M.M.	16,2	23,2
E.T.	14,9	28,5	G.W.	16,1	26,7
			J.B.	15,8	26,7
	CLL	K		AL	K
	sec	sec		sec	sec
C.K.	14,3	26,3	D.K.	15,0	24,3
E.G.	26,6	26,9	H.B.	16,0	26,3
E.R.	26,4	26,9	G.M.	16,5	20,0
A.H.	24,8	26,9	H.H.	18,1	17,1
G.F.	14,6	17,1	L.T.	16,5	25,5
H.D.	17,5	23,2	K.S.	17,5	23,2
H.M.	18,9	23,2	G.A.	16,5	23,2
P.W.	16,5	23,2	H.G.	15,4	26,7
H.G.	17,9	23,2	E.G.	22,1	26,7
K.W.	16,6	23,2	H.N.	14,7	25,5
A.G.	13,9	17,1			

Tab. 6: Einfluß von Leukozyten auf den Prothrombinverbrauch (20.000 Leukozyten/mm^3, K = Boratpufferkontrolle)

	NL (n=10)	CML (n=11)	CLL (n=11)	AL (n=10)	K
$\bar{x}$ (sec)	14,5	14,9	18,9	16,8	24,0
s (sec)	1,4	1,6	4,8	2,1	3,0

Tab. 7: Einfluß von Leukozyten auf den Prothrombinverbrauch, Mittelwerte und Standardabweichungen (20.000 Leukozyten/mm^3)

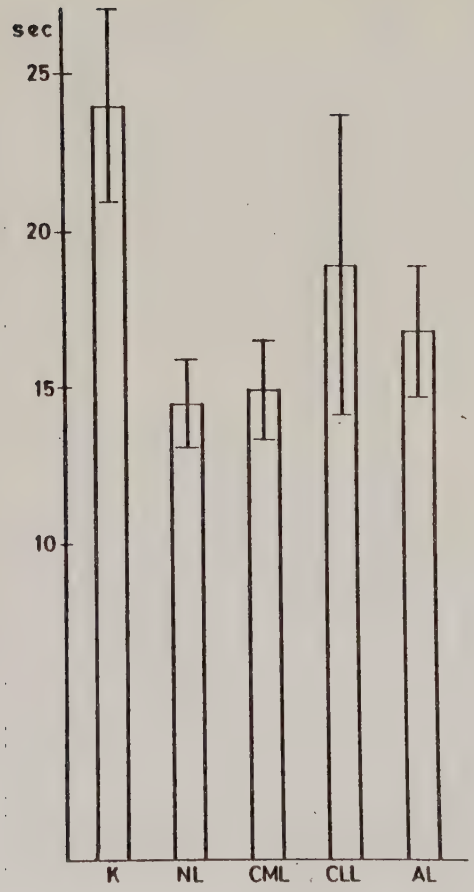

Abb. 11: Beeinflussung des Prothrombinverbrauchs durch Leukozyten (20.000/mm^3)
K = Boratpufferkontrolle

4.5. Zweistufentest nach Nemerson

Mit diesem Test wurde die Gewebsthromboplastinaktivität von Leukozyten gemessen. Ein Maß für die Gewebsthromboplastinaktivität ist die Gerinnungszeit des Testansatzes. Hohe Aktivität bedingt eine kurze Gerinnungszeit.
Die Gewebsthromboplastinaktivität wurde von Leukozyten von 7 Normalpersonen, 6 Patienten mit CML, 7 Patienten mit CLL und 6 Patienten mit AL bestimmt (Tabellen 8 und 9). Im Zweistufentest wurden Konzentrationen von 100.000, 50.000, 20.000, 5.000 und 1.000 Leukozyten/mm^3 verwendet. Bei einigen Patienten konnte keine Bestimmung mit 100.000 und 50.000 Leukozyten/mm^3 durchgeführt werden, da nicht ausreichend Leukozyten gewonnen werden konnten.
Die Ergebnisse der Gewebsthromboplastinaktivität normaler und leukämischer Leukozyten sind in Tabelle 10 aufgeführt.
Abbildungen 12 und 13 wurden auf doppellogarithmisches Papier (Zeit und Leukozytenkonzentration logarithmisch) aufgetragen.

Abbildung 12 zeigt,daß die Gewebsthromboplastinaktivität mit steigender Konzentration zunahm. Normale Leukozyten, Leukozyten von Patienten mit CML und Leukozyten von Patienten mit CLL wiesen deutliche Unterschiede auf. Die Leukozyten von Patienten mit CML besaßen eine etwas höhere Aktivität als normale Leukozyten. Die Leukozyten von Patienten mit CLL hatten eine sehr geringe Gewebsthromboplastinaktivität. Leukozyten von Patienten mit AL hatten im Mittel eine Gewebsthromboplastinaktivität, die zwischen normalen Leukozyten und Leukozyten von Patienten mit CML lag. Da nur wenige Fälle von Al mit einer Konzentration von 50.000 und 100.000 Leukozyten/mm^3 zur Verfügung standen, sind die Mittelwerte bei diesen hohen Konzentrationen nicht repräsentativ. Der Knick in der AL - Kurve läßt sich dadurch erklären.
Aufgrund der sehr unterschiedlichen Ergebnisse der Leukozyten von Patienten mit AL wurde für die AL eine zusätzliche Abbildung (13) angefertigt. Die Kurven sind mit den Initialen der Patienten gekennzeichnet. Hier werden die beträchtlichen Unterschiede zwischen den einzelnen AL deutlich.

L.T. Die Leukozyten des Patienten L.T. erwiesen sich als äußerst gerinnungsaktiv. Sie hatten die höchste Gewebsthromboplastinaktivität von allen untersuchten Leukozyten.

H.N., G.M. und H.G. Diese Leukozyten entsprachen in ihrer Gewebsthromboplastinaktivität der der CML. Die Werte des Patienten H.G. wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit in die Abbildung nicht eingezeichnet.

K.S. Die Leukozyten des Patienten K.S. verhielten sich ähnlich wie die Leukozyten von einem Patienten mit CLL.

H.H. Diese Leukozyten hatten eine Besonderheit, die sonst bei keinen der untersuchten Leukozyten auftraten. Die Gerinnungszeit nahm kontinuierlich von 1.000 bis 20.000 Leukozyten/mm^3 ab, erreichte einen Tiefpunkt bei 20.000 Leukozyten/mm^3 und stieg bei 50.000 und 100.000 Leukozyten/mm^3 wieder deutlich an. Gegen eine Fehlbestimmung spricht die kontinuierlich abnehmende und dann wieder zunehmende Zeit. Dies läßt sich unter Umständen so interpretieren, daß sich gerinnungshemmende Einflüsse dieser Leukozyten bei sehr hohen Konzentrationen bemerkbar machen und dem Gewebsthromboplastin entgegenwirken. Dies könnte möglicherweise durch eine Hemmung der Faktor X - Aktivierung oder durch eine Hemmung der Reaktion Prothrombin — Thrombin erfolgen. Für eine starke gerinnungshemmende Aktivität spricht auch die Ungerinnbarkeit der Faktor VIII - bzw. Faktor IX - Mangelplasmas nach Zugabe von Leukozyten des Patienten H.H.

In Abbildungen 14 und 15 wurden die Werte der verschiedenen Leukozyten bei einer Konzentration von 20.000/mm^3 aufgezeichnet. Der Kontrollwert wurde aus allen Kontrollen gemittelt. Man erkennt deutlich die Unterschiede, die sich zwischen normalen Leukozyten, Leukozyten von Patienten mit CML, CLL und AL ergeben.

Um die Frage zu klären, ob Gewebsthromboplastin in granulozytären, lymphozytären Leukozyten oder in Monozyten lokalisiert ist, ist es sinnvoll, die Differentialblutbilder zu betrachten. Die größte Gewebsthromboplastinaktivität war bei der CML mit im Mittel 91 % granulozytären Zellen, 6 % Lymphozyten und 3 % Monozyten zu finden.

Eine etwas geringere Aktivität besaßen normale Leukozyten, die aus 84 % Granulozyten, 12 % Lymphozyten und 4 % Monozyten bestanden. Die niedrigste Aktivität wurde bei der CLL mit 96 % lymphozytären Zellen und 4 % Granulozyten gemessen.
Diese Verteilung läßt die Aussage zu, das Gewebsthromboplastin überwiegend in granulozytären Zellen lokalisiert ist, lymphozytäre Zellen enthalten kein oder nur sehr wenig Gewebsthromboplastin. Die geringe Gewebsthromboplastinaktivität, die bei den Zellen von Patienten mit CLL gemessen wurde, stammte wahrscheinlich aus den 4 % Granulozyten. Monozyten waren in den Blutbildern zahlenmäßig sehr gering vertreten, so daß ihr Einfluß auf die Blutgerinnung nicht sicher zu beurteilen war.

Um einen Vergleich mit der Gewebsthromboplastinaktivität einer Standardlösung zu erhalten, wurde Simplastin (Simplastin Calcium free Warner Lambert Pharmaceutical Co., Morris Plains, N.J. USA) als Standard für ein Gewebsthromboplastin verwendet.
Wie sich aus Tabelle 11 ergibt, ist die Gewebsthromboplastinaktivität des kommerziellen Thromboplastins ungleich höher als die von Leukozyten. Eine Leukozytenkonzentration von 5.000 normalen Leukozyten/mm^3 entspricht etwa einer 1 : 10.000 Simplastinverdünnung. Eine Leukozytenkonzentration von 50.000 CML - Leukozyten/mm^3 entspricht etwa einer 1 : 1.000 Verdünnung. Die absolute Gewebsthromboplastinaktivität der Leukozyten bei Vergleich mit Simplastin ist aufgrund dieser Ergebnisse sehr gering.

Normale Leukozyten

Leuko/mm^3	R.S.	A.B.	J.M.	U.K.	A.D.	E.Z.	E.T.
100.000	——	58,3	55,6	83,9	74,6	68,1	112,4
50.000	75,1	62,1	59,8	85,4	87,0	76,0	93,4
20.000	85,0	80,3	75,8	109,4	104,3	92,6	112,3
5.000	107,2	109,0	106,8	140,6	147,9	119,7	139,7
1.000	129,4	152,2	151,4	175,3	198,5	150,0	179,7
Kontrolle	147,1	180,1	180,1	201,8	219,6	183,7	208,7

CML - Leukozyten

Leuko/mm^3	H.T.	O.H.	E.G.	A.L.	E.H.	E.F.
100.000	40,4	——	67,1	46,9	49,9	49,1
50.000	41,0	77,9	70,7	52,3	52,3	57,2
20.000	62,5	84,2	85,0	63,5	59,8	70,8
5.000	77,3	111,9	118,5	93,2	81,5	94,8
1.000	125,5	162,4	166,7	126,7	125,4	131,6
Kontrolle	185,6	200,9	180,1	207,4	235,1	191,8

Tab. 8: Beeinflussung des Zweistufentests nach Nemerson durch normale Leukozyten und Leukozyten von Patienten mit CML (Werte in sec)

CLL - Leukozyten

Leuko/mm^3	G.F.	A.G.	H.D.	H.M.	P.W.	H.G.	K.W.
100.000	133,8	108,0	101,2	96,3	95,2	86,0	103,2
50.000	136,3	123,5	113,4	112,4	127,6	102,2	123,0
20.000	163,8	147,5	146,4	140,4	139,1	129,3	159,4
5.000	184,0	181,2	172,7	169,3	171,5	167,9	133,1
1.000	184,7	183,3	185,5	185,4	191,9	184,0	188,8
Kontrolle	189,5	189,5	193,9	198,1	202,5	201,3	203,1

AL - Leukozyten

Leuko/mm^3	G.M.	H.H.	H.G.	H.N.	L.T.	K.S.
100.000	49,5	157,8	——	65,3	30,0	136,3
50.000	——	147,1	——	86,3	33,7	143,1
20.000	66,5	128,5	73,6	78,7	47,8	150,2
5.000	104,1	136,5	97,3	96,9	64,0	163,4
1.000	150,0	143,3	127,7	118,3	93,9	164,5
Kontrolle	185,6	185,6	185,6	——	161,1	194,1

Tab. 9: Beeinflussung des Zweistufentests nach Nemerson durch Leukozyten von Patienten mit CLL und AL (Werte in sec)

Leukozyten/mm³	NL			CML		
	$\bar{x}$(sec)	s(sec)	n	$\bar{x}$(sec)	s(sec)	n
100.000	68,1	11,7	6	50,7	9,9	5
50.000	77,0	12,7	7	58,6	13,5	6
20.000	94,2	14,6	7	71,0	11,2	6
5.000	124,4	17,9	7	96,2	16,3	6
1.000	162,3	23,7	7	139,7	19,4	6
Kontrolle	188,7	23,9	7	200,2	19,8	6

Leukozyten/mm³	CLL			AL		
	$\bar{x}$(sec)	s(sec)	n	$\bar{x}$(sec)	s(sec)	n
100.000	103,4	15,1	7	87,8	56,1	5
50.000	119,8	11,3	7	102,6	53,7	4
20.000	146,6	11,9	7	90,9	39,6	6
5.000	177,1	9,3	7	110,4	34,8	6
1.000	186,2	3,1	7	132,4	24,3	6
Kontrolle	196,8	5,9	7	182,4	12,5	5

Tab. 10: Mittelwerte und Standardabweichungen der Gewebsthromboplastinaktivität (sec) von normalen und leukämischen Leukozyten

Simplastin - verdünnung	Gewebsthrombo-plastinaktivität	
	$\bar{x}$ (sec)	s (sec)
1 : 100	30,1	5,2
1 : 1.000	59,8	7,9
1 : 10.000	124,3	20,2
1 : 20.000	140,7	17,1

Tab. 11: Gewebsthromboplastinaktivität eines kommerziellen Thromboplastins (Simplastin) von verschiedenen Verdünnungen, (n = 5)

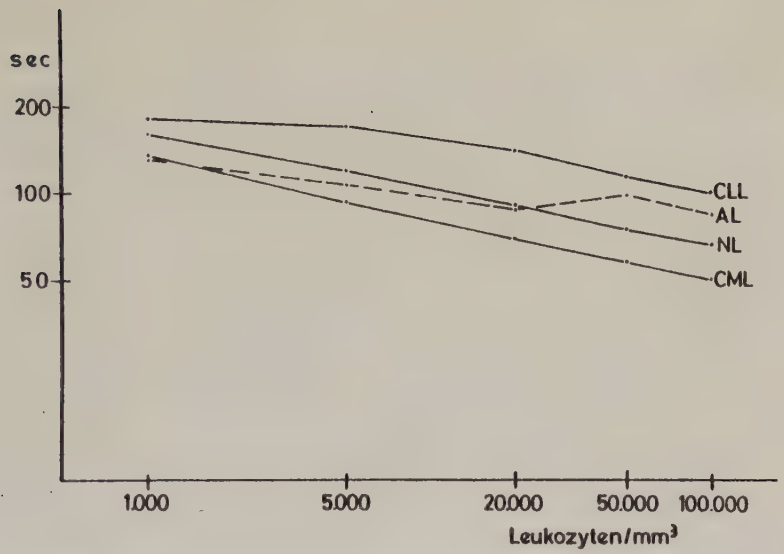

Abb. 12: Gewebsthromboplastinaktivität in Abhängigkeit von der Leukozytenkonzentration

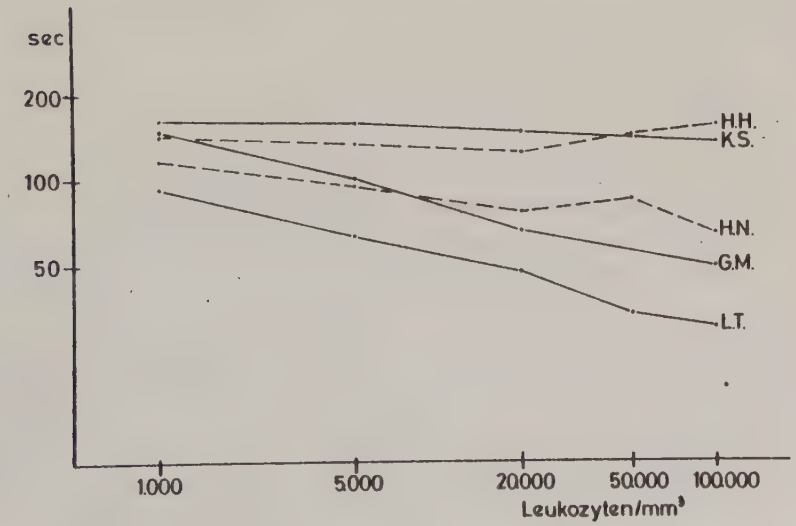

Abb. 13: Gewebsthromboplastinaktivität von Patienten mit AL in Abhängigkeit von der Leukozytenkonzentration

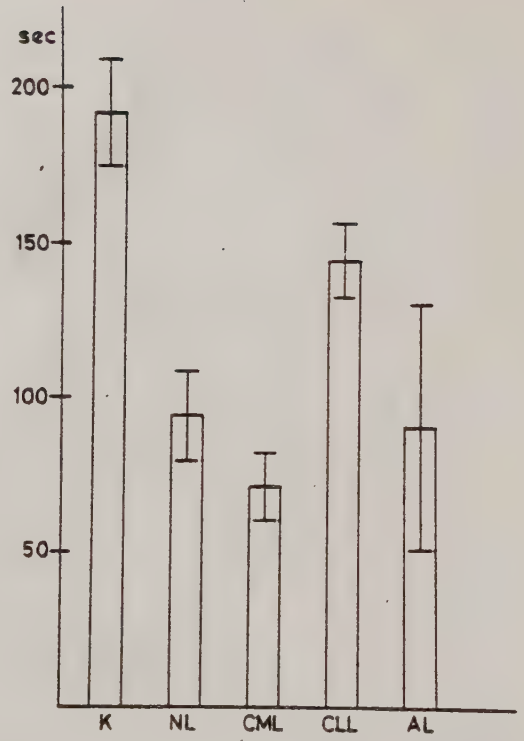

Abb. 14: Gewebsthromboplastinaktivität bei einer Leukozytenkonzentration von 20.000/mm^3

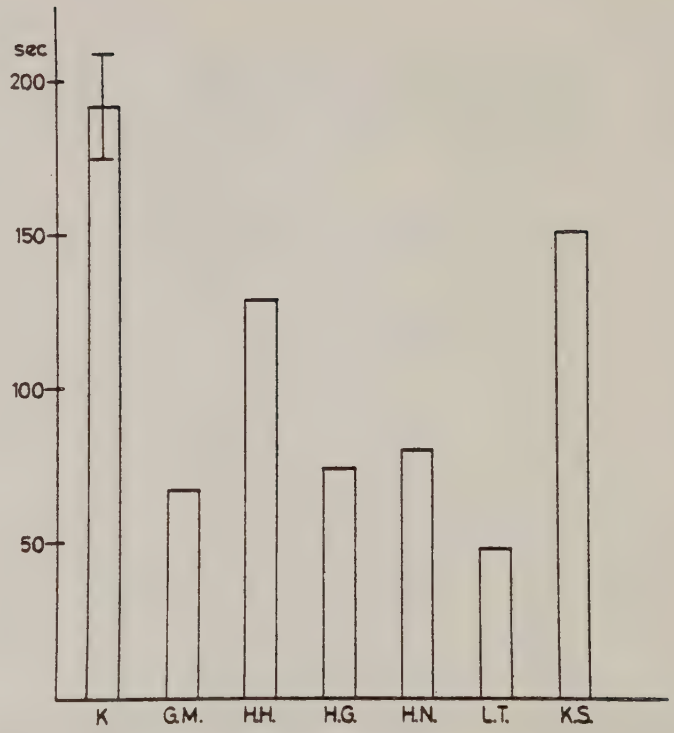

Abb. 15: Gewebsthromboplastinaktivität von Patienten mit Al bei einer Leukozytenkonzentration von 20.000/mm^3

5. Diskussion

Ist das Gleichgewicht der normalen Hämostase gestört und tritt eine Steigerung der normalen Gerinnungsfähigkeit des Blutes ein, kann es zu einer intravasalen Gerinnung kommen. So führt z. B. die Einschwemmung von Gewebsbestandteilen in das Gefäßsystem zu einer Aktivierung des exogenen Gerinnungssystems und damit entweder zu einer disseminierten Gerinnselbildung in multiplen Organen oder zu thrombembolischen Komplikationen. Die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) oder Verbrauchskoagulopathie wird sehr häufig als Folge einer vorzeitigen Plazentalösung, einer Fruchtwasserembolie, eines Endotoxinschocks und metastasierender Karzinome gesehen (Lasch et al., 1971).
Auch die akute Promyelozytenleukämie wird fast stets durch eine Verbrauchskoagulopathie kompliziert (Rosenthal, 1963; Didisheim et al., 1964; Straub et al., 1967; Gralnick et al., 1972 a; Sultan et al., 1973).
Die Untersuchungen von Leukozyten akuter, nicht promyelozytärer Leukosen und chronischer Leukämien sollte zur Klärung der Frage beitragen, ob auch bei diesen Erkrankungen ein spontaner oder therapeutisch induzierter Zellzerfall durch Freisetzung gerinnungsaktiven Materials zu plasmatischen Gerinnungsstörungen und damit eventuell zu Verbrauchskoagulopathien führen könnte.

Der Zweistufentest nach Nemerson (1968) gilt als spezifisch für den Nachweis von Gewebsthromboplastin. Mit diesem empfindlichen, in zwei Stufen ablaufenden Testsystem gelang der Nachweis einer mit Gewebsthromboplastin identischen, gerinnungsfördernden Aktivität in allen untersuchten Leukozytenpräparationen.
Die höchste Aktivität fand sich in Leukozyten von Patienten mit CML, gefolgt von Leukozyten gesunder Kontrollpersonen und von Leukozyten Kranker mit akuter Leukämie (AL). Eine wesentlich geringere Gewebsthromboplastinaktivität fand sich in den Lymphoblasten von Patienten mit CLL. Auffallend war die weite Streuung der Aktivitäten in Myeloblasten akuter Leukämien.

Auch andere Untersucher postulierten, daß Leukozyten eine mit Gewebsthromboplastin identische gerinnungsfördernde Substanz enthalten. Gewebsthromboplastin wurde sowohl in normalen gemischten Leukozyten als auch in leukämischen Leukozyten beschrieben (Lisiewicz, 1969; Garg und Niemetz, 1973; Gralnick und Abrell, 1973; Sakuragawa et al., 1976).

Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen fanden Garg und Niemetz (1973) in Leukozyten von Patienten mit CML eine geringere Aktivität als in normalen Leukozyten.

In Promyelozyten, die von Patienten mit Promyelozytenleukämie isoliert wurden, fand sich die weitaus höchste Gewebsthromboplastinaktivität aller Leukozyten in vitro (Gouault - Heilmann et al., 1972; Gralnick und Abrell, 1973; Sakuragawa et al., 1976). Tierexperimentell konnten Sakuragawa et al. (1976) durch Infusion von Lysaten von Promyelozyten in Kaninchen eine typische disseminierte intravasale Gerinnung auslösen. Diese Befunde erklären die häufig bei der akuten Promyelozytenleukämie gesehene Verbrauchskoagulopathie.

Die relativ geringe Thromboplastinaktivität normaler Leukozyten ließ sich durch Inkubation in einem Kulturmedium und Stimulierung mit Endotoxin wesentlich steigern (Lerner et al., 1971; Niemetz, 1972; Garg und Niemetz, 1973; Hiller et al., 1976). Die Infusion Endotoxin - stimulierter Leukozyten führte in Kaninchen zu einer schweren Mikrothrombosierung (Niemetz und Fani, 1973; Müller - Berghaus et al., 1976).

Ein generalisiertes Shwartzman - Sanarelli - Syndrom ließ sich nicht auslösen, wenn Versuchstiere vor Endotoxin - Injektion durch Stickstoff - Lost neutropenisch gemacht wurden (Lerner et al., 1968; Horn und Collins, 1968; Bohn und Müller - Berghaus, 1976). Dies weist auf die Bedeutung der Leukozyten als Vermittler dieses tierexperimentellen Phänomens hin.

Bisher wurde auf Grund dieser tierexperimentellen Untersuchungen angenommen, daß Granulozyten entscheidend an der Auslösung des generalisierten Shwartzman - Sanarelli - Syndroms beteiligt waren (Horn und Collins, 1968; Lerner et al., 1968; Kociba et al., 1972; Bhhn und Müller - Berghaus, 1976). Diese Tatsache wird auch durch die eigenen in vitro Untersuchungen gestützt.

Es fiel auf, daß die Gewebsthromboplastinaktivität in den Zellpräparationen, die überwiegend granulozytäre Zellen enthielten, am höchsten war. Jüngste Untersuchungen lassen allerdings vermuten, daß Monozyten die höchste gerinnungsfördernde Aktivität besitzen (Rivers et al., 1975; Hiller et al., 1977). Da in den eigenen Zellpräparationen Monozyten nur 0,3 - 3,9 % ausmachten, konnte ihr Einfluß nicht sicher beurteilt werden.
Es ist unwahrscheinlich, daß neben Gewebsthromboplastin ein zusätzlicher gerinnungsfördernder Mechanismus von Leukozyten ausgeht. Leukozyten enthalten weder Gerinnungsfaktoren (Fortýnová und Pospíšilová, 1967), noch sind sie in der Lage, Prothrombin in Thrombin umzuwandeln (Rapaport und Hjort, 1967; Sakuragawa et al., 1976) oder Fibrinogen in Fibrin umzusetzen (Rapaport und Hjort, 1967; Gouault - Heilmann et al., 1972).

In den eigenen Untersuchungen lösten Leukozytenhomogenate von Normalpersonen und Leukämiepatienten trotz ihres vorhandenen Gewebsthromboplastingehalts nach Zugabe zum Testansatz verschiedener Gerinnungsglobaltests (Einstufentests) keine Gerinnungszeitverkürzung, sondern eine -Verlängerung aus. Dies galt sowohl für die aktivierte Rekalzifizierungszeit als auch die partielle Thromboplastinzeit mit Faktor VIII - und IX - Mangelplasma. Auch im Prothrombinverbrauchstest führten die Leukozytenhomogenate zu einem geringeren Prothrombinverbrauch als der Kontrollansatz ohne Leukozyten. Hingegen führte die Zugabe von Leukozyten zu Nativblut im Thrombelastogramm zu einer geringen Verkürzung der Reaktionszeiten.
Ähnliche Befunde wurden auch von Gralnick und Abrell (1973) und Saba et al. (1973) bei der Untersuchung zerstörter menschlicher Leukozyten beschrieben. Im Gegensatz dazu sahen Saba et al. (1973) jedoch nach Zugabe intakter menschlicher Leukozyten und intakter oder zerstörter Kaninchenleukozyten zum Testansatz von Rekalzifizierungszeit und partieller Thromboplastinzeit eine eindeutige Verkürzung der Gerinnungszeiten. Extrakte normaler Leukozyten führten nach Lisiewicz (1969) und Lisiewicz et al. (1970) zu einer Erhöhung des Prothrombinverbrauchs. Eine geringe Verkürzung der Rekalzifizierungszeit durch zerstörte Leukozyten von Patienten mit CLL, CML und AML beobachteten Gouault - Heilmann et al. (1972). Sehr ausgeprägt

war die Verkürzung der Rekalzifizierungszeit nach Zugabe von Promyelozyten.
Die unterschiedliche Beeinflussung der Gerinnungsglobaltests durch Leukozyten scheint nach den vorliegenden Ergebnissen verschiedener Untersucher von der Tierspezies und der Art der Leukozytenpräparation abhängig zu sein. So führten intakte humane Leukozyten zu einer Gerinnungsaktivierung, zerstörte dagegen zu einer Hemmung im Einstufentestsystem (Saba et al., 1973).
In den eigenen Untersuchungen wurden nur zerstörte, d. h. homogenisierte Leukozyten verwendet, da nach zytostatischer Behandlung in vivo ebenfalls von zerstörten Leukozyten auszugehen ist. Intakte Leukozyten verklumpten auch sehr leicht und ließen somit keine exakten Verdünnungen und reproduzierbaren Paralleluntersuchungen zu.

Eine gerinnungshemmende Aktivität in Leukozyten wurde von verschiedenen Untersuchern angenommen. Rapaport und Hjort (1967) wiesen eine Gerinnungszeitverzögerung durch zerstörte Kaninchenleukozyten nach, wenn Plasma mit dem Cephalin Reagenz der Russel - Viper versetzt wurde. Da dieses Cephalin Reagenz Faktor X direkt aktiviert, lassen die Beobachtungen vermuten, daß das Antikoagulans entweder mit einem Schritt bei der Bildung der Prothrombinase oder bei der Interaktion zwischen Prothrombinase und Prothrombin interferiert.

Saba et al. (1967) isolierten aus Lysosomen von Kaninchenleukozyten eine kationische Proteinfraktion, die einen starken gerinnungshemmenden Einfluß auf menschliches Blut in vitro besaß. Nach ihrer Auffassung inhibierten die kationischen lysosomalen Enzyme die Bildung von endogenem (intrinsic) Thromboplastin, indem sie mit einer oder mehreren Reaktionen interferierten, in die Faktor V, Faktor X, Phospholipid und Calcium verwickelt sind. Da es zu keiner Verlängerung der Thrombinzeit kam, wurde eine Antithrombinaktivität nicht angenommen.
Eine Antithrombinaktivität in normalen und leukämischen Leukozyten wurde hingegen von anderen beschrieben (Lisiewicz, 1969; Lisiewicz et al., 1970; Hiller und Heni, 1977). Diese gerinnungshemmende Aktivität inhibierte in Abhängigkeit von der Zeit in zunehmendem Maße Thrombin.

Aufgrund dieser Ergebnisse muß man zwei gerinnungshemmende Mechanismen durch Leukozyten annehmen. Es handelt sich hierbei erstens um eine Hemmung der Faktor X - Aktivierung und zweitens um eine Antithrombinaktivität. Diese gerinnungshemmende Aktivität überwog in der aktivierten Rekalzifizierungszeit, der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit unter Verwendung von Faktor VIII - und IX - Mangelplasma und dem Prothrombinverbrauchstest. Im Thrombelastogramm mit Vollblut kam die gerinnungshemmende Wirkung von Leukozyten weniger stark zur Geltung. Hier kam es im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Plasma und Serum zu einer mäßiggradigen Verkürzung der Reaktionszeit.

Der Antagonismus zwischen dem gerinnungsbeschleunigendem Gewebsthromboplastin einerseits und dem Antithrombin wie auch der Hemmung der Faktor X - Aktivierung andrerseits könnte beim Untergang großer Massen von Leukozyten thrombembolische Komplikationen verhindern und somit von Vorteil sein. Das Fehlen von Verbrauchskoagulopathien bei der Therapie chronischer Leukosen, die zum Untergang großer Zellmassen führt, kann wahrscheinlich durch diesen Antagonismus erklärt werden. Bei der akuten Promyelozytenleukämie hingegen treten Verbrauchskoagulopathien sehr häufig auf (Rosenthal, 1963; Didisheim et al., 1964; Straub et al., 1967; Gralnick et al., 1972 a). Diese Verbrauchsreaktion wird wahrscheinlich durch die sehr hohe Gewebsthromboplastinaktivität von Promyelozyten hervorgerufen (Gralnick und Abrell, 1973; Sakuragawa et al., 1976).
Bei akuten, nicht promyelozytären Leukämien treten zwar Verbrauchsreaktionen weniger häufig auf, sind jedoch besonders bei hohen untergehenden Zellmassen eine ernst zu nehmende Komplikation (Gralnick et al., 1972 a; Brakman et al., 1970). In den eigenen Untersuchungen fiel eine große Streubreite der Gewebsthromboplastinaktivitäten der Myeloblasten von Patienten mit AL auf. Besonders in den Fällen, in denen die Aktivität sehr hoch ist, muß mit Komplikationen im Sinne einer Verbrauchskoagulopathie gerechnet werden. Wahrscheinlich wird dieser Prozeß durch das Fehlen einer Antithrombinaktivität (Hiller und Heni, 1977) und einer fibrinolytischen Aktivität (Watanabe, 1970) begünstigt.

6. Zusammenfassung

Leukozyten von Normalpersonen und von Patienten mit chronisch myeloischer, chronisch lymphatischer und akuter Leukämie wurden über Ronpacon^{R}- Dextran isoliert, gewaschen, homogenisiert und verschiedenen Gerinnungstests zugesetzt, um den Einfluß der Leukozyten auf das plasmatische Gerinnungssystem zu untersuchen.

Hierbei fanden sich folgende Ergebnisse:

1) Leukozyten von Normalpersonen und Leukämiepatienten besaßen eine relativ schwache Gewebsthromboplastinaktivität, welche in einem dafür spezifischen, in zwei Stufen ablaufenden Testsystem nach Nemerson nachgewiesen werden konnte.
2) Die Gewebsthromboplastinaktivität war am höchsten in Leukozyten von Patienten mit CML, gefolgt von Normalleukozyten und Leukozyten von Patienten mit AL. Bei letzteren bestand eine sehr große Streubreite. In Leukozyten von Patienten mit CLL war die Aktivität sehr gering.
3) Die Zugabe von Leukozyten zu Nativblut führte im Thrombelastogramm zu einer geringen Verkürzung der Reaktionszeiten. Die übrigen Meßparameter, Gerinnselbildungszeit und maximale Amplitude blieben unbeeinflußt.
4) Die Zugabe normaler und leukämischer Leukozyten zu einstufigen Gerinnungstests (akt. Rekalzifizierungszeit, aktivierte partielle Thromboplastinzeit mit Faktor VIII - und IX - Mangelplasma, Prothrombinverbrauchstest) führte zu einer Gerinnungsverzögerung.
   Aufgrund der Befunde anderer Untersucher muß angenommen werden, daß die Gerinnungsverzögerung durch Aktivitäten, die gegen Faktor X und Thrombin gerichtet sind, zustandekommen.

Klinische Bedeutung gewinnen die erbrachten Untersuchungsergebnisse für die Therapie akuter und chronischer Leukämien, die oft zu massivem Zellzerfall führen.

Das Fehlen von Verbrauchsreaktionen bei chronischen Leukämien (CML, CLL) dürfte auf das Überwiegen der gerinnungshemmenden Aktivität zurückzuführen sein. Die zuweilen bei akuten Leukämien und ganz besonders bei akuten Promyelozytenleukämien gesehene Verbrauchsreaktion ist wahrscheinlich auf ein Überwiegen der Gewebsthromboplastinaktivitäten zurückzuführen.

7. Literaturverzeichnis

1. Böyum A.
   Separation of White Blood Cells
   Nature 204, 793 - 794 (1964)

2. Böyum A.
   Separation of Leukocytes from Blood and Bone Marrow
   Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, Suppl. 97, 77 - 89 (1968)

3. Bolm E. and G. Müller - Berghaus
   The Effect of Leukocyte and Platelet Transfusion on the Activation of Intravascular Coagulation by Endotoxin in Granulocytopenic and Thrombocytopenic Rabbits
   Am. J. Pathol. 84, 239 - 258 (1976)

4. Bowie W. E. J., J. H. Thompson, P. Didisheim and C. A. Owen Jr.
   Mayo Clinic Laboratory Manual of Hemostasis
   Philadelphia, London, Toronto: W. B. Saunders Comp. 1971

5. Brakman P., J. Snyder, E. S. Henderson and T. Astrup
   Blood Coagulation and Fibrinolysis in Acute Leukaemia
   Br. J. Haematol. 18, 135 - 145 (1970)

6. Brown R. C., D. C. Campbell and J. M. Thompson
   Increased Fibrinolysin with Malignant Disease, Report of two Cases
   Arch. Intern. Med. 109, 201 - 204 (1962)

7. Didisheim P., Thrombold J. S., Vandervoort R. L. E. and R. S. Mibashan
   Acute Promyelocytic Leukemia with Fibrinogen and Factor V Deficiences
   Blood 23, 717 - 728 (1964)

8. Eiseman G. and M. Stefanini
   Thromboplastic Activity of Leukemic White Cells
   Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N.Y.) 86, 763 - 765 (1954)

9. Erdogan G.
   The Thromboplastic Activity of White Blood Cells
   Blut 17, 276 - 278 (1968)

10. Farkass E.
    Nach Strahlenbehandlung aufgetretene, mit Hämolyse und Defibrinationssyndrom komplizierte chronische lymphatische Leukämie
    Z. Gesamte Inn. Med. 17, 597 - 599 (1962)

11. Fortýnová J. and V. Pospíšilová
    Untersuchung der plasmatischen Atmosphäre der Leukozyten im Hinblick auf das Vorhandensein von Gerinnungsfaktoren
    Folia Haematol. 82, 220 - 237 (1967)

12. Garg S. K. and J. Niemetz
    Tissue Factor Activity of Normal and Leukemic Cells
    Blood 42, 729 - 735 (1973)

13. German H. J., J. A. Smith and J. Lindenbaum
Chronic Intravascular Coagulation Associated with Chronic Myelocytic Leukemia
Am. J. Med. 61, 547 - 552 (1976)

14. Gouault - Heilmann M., E. Chardon, C. Sultan and F. Josso
The Procoagulant Factor of Leukaemic Promyelocytes Demonstration of Immunologic Cross Reactivity with Human Brain Tissue Factor
Br. J. Haematol. 30, 151 - 158 (1975)

15. Gouault - Heilmann M., B. Varet, Cl. Romano et F. Josso
Activité Thromboplastique des Leucocytes in vitro et Coagulation intravasculaire au cours des leucémies
Pathol. Biol. Suppl 20, 56 - 64 (1972)

16. Gralnick H. R. and E. Abrell
Studies of the Procoagulant and Fibrinolytic Activity of Promyelocytes in Acute Promyelocytic Leukaemia
Br. J. Haematol. 24, 89 - 100 (1973)

17a Gralnick H. R., J. Bagley and E. Abrell
Heparin Tratment for the Hemorrhagic Diathesis of Acute Promyelocytic Leukemia
Am. J. Med. 52, 167 - 174 (1972)

17b Gralnick H. R., S. Marchesi and H. Givelber
Intravascular Coagulation in Acute Leukemia: Clinical and Subclinical Abnormalities
Blood 40, 709 - 718 (1972)

18. Hartert H.
Thrombelastography in Bang N. U., F. K. Beller, E. Deutsch and E. F. Mammen: Thrombosis and Bleeding Disorders, Theory and Methods
Stuttgart, New York, London: Thieme 1971 70 - 76

19. Hey D. and H. G. Lasch
Coagulopathien bei Leukosen in: Gross R. und J. van de Loo: Leukämie
Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1972 437 - 442

20. Hiller E. und N. Heni
Die Beeinflussung des plasmatischen Gerinnungssystems durch normale und leukämische Leukozyten
Fortschr. Med. 28, 1753 - 1756 (1977)

21. Hiller E., J. G. Saal und G. W. Griffiths
Die Beeinflussung des exogenen Gerinnungssystems durch Endotoxin - stimulierte Monozyten
Blut 34, 409 - 412 (1977)

22. Hiller E., H. J. Schmid, P. Ostendorf und G. W. Griffiths
Der Einfluß von Endotoxin auf die Gerinnungsaktivität von Leukozyten
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 82, 1632 - 1635 (1976)

23. Horn R. G. and R. D. Collins
Studies on the Pathogenesis of the Generalized Shwartzman Reaction; The Role of Granulocytes
Lab. Invest. 18, 101 - 107 (1968)

24. Lasch H.G., K. Huth, D. L. Heene, G. Müller - Berghaus, M.-H. Hörder, H. Janzarik, C. Mittermayer und W. Sandritter
Klinik der Verbrauchskoagulopathie
Dtsch. Med. Wschr. 17, 715 - 727 (1971)

25. Lenggenhager K.
Weitere Fortschritte in der Blutgerinnungslehre
Stuttgart: Thieme 1949, 57 - 64

26. Lerner R. G., R. Goldstein und G. Cummings
Stimulation of Human Leukocyte Thromboplastic Activity by Endotoxin
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138, 145 - 148 (1971)

27. Lerner R. G., S. J. Rapaport and J. M. Spitzer
Endotoxin - Induced Intravascular Clotting: The Need for Granulocytes
Thromb. Haemostas. 20, 430 - 443 (1968)

28. Lisiewicz J.
Studies on the Influence of Normal and Leukemic Leukocytes on Blood Coagulation
Ann. Med. Sect. Pol. Acad. Sci. 13, 233 - 278 (1969)

29. Lisiewicz J., G. Astaldi, J. Okulski and R. Merolla
On the Influence of Normal and Leukemic Human Leukocytes on Blood Coagulation
Acta Haematol. 44, 332 - 340 (1970)

30 MacFarlane R. G.
An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism and its Function as a Biochemical Amplifier
Nature (London) 202, 498 - 499 (1964)

31. Martin H. und L. Roka
Beeinflussung der Blutgerinnung durch Leukozyten
Klin. Wschr. 29, 510 - 512 (1951)

32. Müller - Berghaus G., E. Bohn and W. Höbel
Activation of Intravascular Coagulation by Endotoxin: The Significance of Granulocytes and Platelets
Br. J. Haematol. 33, 213 - 220 (1976)

33. Nemerson Y.
The reaction between Bovine Brain Tissue Factor and Factors VII and X
Biochemistry 5, 601 - 608 (1966)

34. Nemerson Y.
The Phospholipid Requirement of Tissue Factor in Blood Coagulation
J. Clin. Invest. 47, 72 - 80 (1968)

35. Niemetz J.
Coagulant Activity of Leukocytes, Tissue Factor Activity
J. Clin. Invest. 51, 307 - 313 (1972)

36. Niemetz J. and K. Fani
Thrombogenic Activity of Leukocytes
Blood 42, 47 - 59 (1973)

37. Prydz H.
Factor VII and Tissue Thromboplastin in: H. C. Hemker, E. A. Loeliger and J. J. Veltkamp: Human Blood Coagulation
Leiden University Press 1, 83 - 88 (1969)

38. Rapaport S. J. and P. F. Hjort
The Blood Clotting Properties of Rabbit Peritoneal Leukocytes in vitro
Thromb. Haemostas. 17, 222 - 236 (1967)

39. Rick W.
Klinische Chemie und Mikroskopie, 3. Auflage
Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1974

40. Rivers R. P. A., W. E. Hathaway and W. L. Weston
The Endotoxin - induced Coagulant Activity of Human Monocytes
Br. J. Haematol. 30, 311 - 316 (1975)

41. Rosenthal R. L.
Acute Promyelocytic Leukemia Associated with Hypofibrinogenemia
Blood 21, 495 - 508 (1963)

42. Saba H. J., J. C. Herion, R. J. Walker and H. R. Roberts
The Procoagulant Activity of Granulocytes
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142, 614 - 620 (1973)

43. Saba H. J., H. R. Roberts and J. C. Herion
The Anticoagulant Activity of Lysosomal Cationic Proteins from Polymorphonuclear Leukocytes
J. Clin. Invest. 46, 580 - 589 (1967)

44. Sakuragawa N., K. Takahashi, M. Hoshiyama, C. Jimbo, M. Matsuoka and Y. Oniski
Pathologic Cells as Procoagulant Substance of Disseminated Intravascular Coagulation Syndrome in Acute Promyelocytic Leukemia
Thromb. Res. 8, 263 - 273 (1976)

45. Seligman B. R., F. Rosner and R. B. Solomon
Chronic Myelogenous Leukemia, Disseminated Intravascular Coagulation and Chloromas Containing Sea-blue Histiocytes
NY State J. Med. 75, 1271 - 1274 (1975)

46. Straub P. W., E. O. Meili und P. G. Frick
Gerinnungsstörung bei akuter Leukämie, insbesondere Promyelozytenleukämie
Schweiz. Med. Wschr. 97, 1464 - 1465 (1967)

47. Sultan C., M. Heilmann - Gouault and M. Tulliez
Relationship between Blast-Cell Morphology and Occurrence of a Syndrome of Disseminated Intravascular Coagulation
Br. J. Haematol. 24, 255 - 259 (1973)

48. Voss D.
Standardisierung von Tests, Erfassung von Störungen im "intrinsic system" der Blutgerinnung unter den Bedingungen der maximalen Kontaktaktivierung mit Celit
Thromb. Haemostas. 12, 295 - 306 (1964)

49. Watanabe K.
Fibrinolytic Activity of Leukemic Cells
Keio J. Med. 19, 47 - 59 (1970)

L E B E N S L A U F

Am 4.9.1952 wurde ich, Norbert Heni, als Sohn des Gymnasialprofessors Richard Heni und seiner Ehefrau Beate Heni, geb. Wagner, in Ehingen geboren. Von 1959 bis 1963 besuchte ich die Konrad-Witz-Schule in Rottweil. Ab 1963 war ich im Albertus-Magnus-Gymnasium in Rottweil, das ich im Juni 1971 mit dem Reifezeugnis verließ. Seit dem Sommersemester 1973 studierte ich in Tübingen Humanmedizin. Am 30.4.1980 legte ich das Staatsexamen in Tübingen ab.